



**Università di Pisa**  
**Facoltà di Medicina e Chirurgia**  
**Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale**

**Scuola di Specializzazione in Endocrinologia e Malattie del  
Metabolismo**

**Tesi di specializzazione:**

**SIGNIFICATO DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE INSULINICO  
NEL CARCINOMA MAMMARIO DI TOPI IPERINSULINEMICI (MKR)**

Candidata: Dr.ssa Valentina Belardi

Relatore :Prof. Claudio Giani

Anno accademico 2013/2014





# INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	1
<b>PREMESSA</b> .....	5
<b>INTRODUZIONE</b> .....	7
<b>Insulina e famiglia dei fattori di crescita insulino simili</b> .....	7
<b>Studi Epidemiologici</b> .....	12
<i>Obesità e Sindrome Metabolica</i> .....	12
<i>Può la risoluzione dell'obesità ridurre il rischio di cancro     e della mortalità cancro-correlata</i> .....	17
<b>Studi clinici</b> .....	19
<i>Insulina e Recettore insulinico</i> .....	20
<i>IGFs e Recettori IGFs</i> .....	21
<b>INSULINA E RECETTORE INSULINICO</b> .....	26
<b>SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	32
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	35
<i>Modello animale</i> .....	35
<i>Immunohistochimica</i> .....	36

<i>Valutazione immunoistochimica al microscopio</i> .....	39
<b>RISULTATI</b> .....	40
<b>DISCUSSIONE</b> .....	49
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	54
<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	65



## **RIASSUNTO**

E' ormai noto che Obesità e Sindrome Metabolica rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie maligne e si associano ad un aumentata mortalità per cancro. L'iperinsulinemia, la resistenza insulinica, l'iperglicemia e l'iperlipidemia sono generalmente riconosciute come le alterazioni metaboliche responsabili dell'associazione obesità-cancro: un ruolo importante sembra essere svolto anche dai fattori di crescita insulino-simili (IGF-1 e IGF-2).

Numerose evidenze epidemiologiche suggeriscono la presenza di una correlazione tra obesità, diabete mellito tipo 2, sindrome metabolica e l'incidenza, la recidiva e la mortalità per carcinoma della mammella.

Studi condotti in vitro e in vivo hanno dimostrato la potente attività promuovente la proliferazione delle cellule tumorali di carcinoma mammario da parte dell'insulina tramite l'attivazione di importanti vie di segnale che regolano la

crescita cellulare come la via del fosfatidil-inositolo-3-idrossi-fosfato (PI3K) e la via delle MAP-kinasi (MAPK).

LeRoith et al. ha sviluppato un modello animale murino non obeso e iperinsulinemico (MKR) utilizzato per lo studio di diverse forme di carcinoma mammario. E' stato dimostrato che il topo MKR rispetto al topo wild type (WT) sviluppa un carcinoma mammario più aggressivo.

In un recente studio Ferguson et.al, utilizzando il modello murino MKR incrociato con un modello Neu-NT (esprimente oncogene Neu-NT corrispettivo HERB2<sup>+</sup> umano) (RTTA/Neu-MKR<sup>+</sup>) ha dimostrato che l'iperinsulinemia è in grado di condizionare lo sviluppo del tumore e la progressione delle metastasi a livello polmonare in maniera significativa rispetto al topo WT attraverso l'attivazione del recettore insulinico (IR), recettore dell'IGF-1 (IGF-1R) e la via della PI3K. Dunque l'iperinsulinemia sembra rappresentare l'elemento fondamentale della progressione del cancro della mammella agendo su specifici recettori la cui attivazione regola la proliferazione cellulare.



In questo studio, utilizzando il modello murino RTTA/Neu-MKR<sup>+</sup>, abbiamo voluto verificare la correlazione tra iperinsulinemia e IR al fine di valutare se un'iperespressione di questo recettore potesse essere tra i possibili responsabili della proliferazione tumorale.

Il recettore insulinico è stato valutato, con la tecnica immunoistochimica, su campioni di tessuto di carcinoma mammario di topi MKR (RTTA/Neu-MKR<sup>+</sup>), su campioni di tessuto di carcinoma mammario di topi WT (RTTA/Neu-MKR<sup>-</sup>) e su tessuto mammario normale di topi WT. L'espressione di IR risultava essere progressivamente maggiore dal tessuto mammario normale-WT, al carcinoma mammario RTTA/Neu-MKR<sup>-</sup> fino alla massima espressione ottenuta nel carcinoma mammario RTTA/Neu-MKR<sup>+</sup>.

I risultati del nostro studio indicano quindi che il recettore insulinico è espresso dal tessuto mammario normale del topo; l'espressione del recettore aumenta in maniera significativa nella trasformazione neoplastica in particolare nei topi iperinsulinemici: in questi ultimi quindi i livelli elevati di insulina hanno la possibilità di interagire con il rispettivo recettore innescando tutti gli eventi a

livello cellulare implicati nella proliferazione neoplastica. Questi dati saranno di notevole importanza per valutare l'opportunità di un nuovo strumento terapeutico nel carcinoma della mammella in particolari condizioni.

## **PREMESSA**

E' noto che Obesità e Sindrome Metabolica, attraverso multipli fattori e complessi meccanismi, rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo di tumori maligni e si associano ad una aumentata mortalità cancro-correlata [1]. In aggiunta molteplici studi epidemiologici hanno dimostrato che particolari tumori quali il cancro del fegato, del colon-retto, del pancreas, della mammella, dell'endometrio, del rene e il mieloma multiplo si sviluppano con una frequenza maggiore in soggetti con diabete mellito [2-8]. L'iperinsulinemia, la resistenza insulinica, l'iperglicemia e l'iperlipidemia sono generalmente riconosciute come le alterazioni metaboliche responsabili dell'associazione obesità-cancro: un ruolo importante sembra essere svolto anche dalla secrezione paracrina dei fattori di crescita insulino-simili (IGFs) [9, 10].

La famiglia delle proteine insuliniche è espressa in maniera ubiquitaria ed ha un effetto pleiotropo sul metabolismo e sulla crescita. Oltre a questa attività fisiologica numerose evidenze sperimentali indicano come l'insulina e IGFs (IGF-1 e IGF-2) sono coinvolti nella proliferazione neoplastica come promotori

tumorali [11]. I dati più importanti sul ruolo dell'insulina, dell'IGF1 e dei loro recettori tissutali nella progressione tumorale e nello sviluppo di metastasi deriva in gran parte da studi condotti su topi [12, 13]. Questi studi hanno permesso di chiarire il ruolo fondamentale del recettore insulinico come mediatore degli effetti sui meccanismi di proliferazione cellulare, non solo attraverso l'interazione con l'insulina ma anche con IGFs.

L'iperinsulinemia, la resistenza insulinica, le alterazioni del metabolismo glucidico rappresentano quindi elementi fondamentali per chiarire l'associazione tra obesità e cancro.

## **INTRODUZIONE**

### **Insulina e famiglia dei fattori di crescita insulino-simili**

La famiglia classicamente include ligandi come l'insulina, IGF-1 e IGF-2, i loro recettori e le sei proteine leganti IGF (IGFBP1-6). I recettori attualmente riconosciuti sono: il recettore insulinico (IR), il recettore IGF-1 (IGF-1R) e il recettore IGF-2 (IGF-2R).

L'insulina è primariamente secreta dalle cellule beta delle isole pancreatiche in risposta al pasto e la sua secrezione è principalmente mediata dai livelli di glucosio circolanti. In condizioni fisiologicamente normali si riconoscono due fasi di rilascio insulinico: una prima fase di breve durata che si verifica dopo pochi minuti dall'incremento della glicemia seguita da una seconda fase più prolungata che dura dai 30 ai 60 minuti. I pazienti obesi e quelli affetti da diabete mellito di tipo 2 hanno un'alterazione della secrezione dell'insulina che si associa generalmente ad una grave resistenza insulinica con conseguente iperinsulinemia.

L'iperinsulinemia è infatti il risultato di due processi principali: uno comporta l'eccessiva stimolazione delle cellule beta pancreatiche a secernere più insulina nel tentativo di superare la resistenza insulinica e questo può essere dimostrato dal parallelo aumento dei livelli di C-peptide e l'altro è la resistenza insulinica stessa. Normalmente l'insulina secreta è rapidamente metabolizzata dal recettore all'interno di tessuti ad alta attività metabolica come ad esempio il fegato mentre nella resistenza insulinica si verifica una riduzione di questa capacità recettoriale con un conseguente intrappolamento dell'insulina nei tessuti.

I IGFs sono stati inizialmente identificati come fattori inducenti ipoglicemia e da qui il loro nome "insulino-simili"; successivamente è stata dimostrata la loro capacità di stimolare la crescita cellulare [9-11] e sono stati quindi riconosciuti come "fattori di crescita insulino-simili". I IGFs sono principalmente prodotti a livello epatico anche se molti altri tessuti sono in grado di sintetizzare sia IGF-1 che IGF-2. A differenza del GH, che è rilasciato in maniera pulsatile dalle cellule ipofisarie, IGF-1 e IGF-2 sono costitutivamente rilasciati e la loro concentrazione in circolo è regolata dalle proteine di trasporto (IGFBPs). Questo consente una concentrazione ematica a livello costante, che è superiore dalle 100 alle 1000 volte

a quella dell'insulina. A livello periferico IGFs vengono rilasciati in quantità minime dalle proteine di trasporto non inducendo quindi ipoglicemia.

IGF-1 ha un ruolo importante nella crescita somatica post-natale mentre IGF-2 è indispensabile per la crescita somatica pre-natale. Le fisiologiche funzioni di IGF-2 dopo la nascita sono tutt'oggi ancora sconosciute. Tuttavia è noto che nella vita adulta i livelli circolanti di IGF-2 sono circa cinque volte maggiori dei livelli circolanti di IGF-1.

IR e IGF-1R sono recettori tirosin-chinasici transmembrana e mediano le funzioni cellulari dei ligandi, mentre IGF-2R è un recettore mannosio-6-fosfato e non è ben chiara la sua attività enzimatica. IR ha una elevata affinità per l'insulina mentre per i IGFs risulta significativamente minore. Al contrario IGF-1R lega con un elevata affinità IGFs e con una minore affinità l'insulina. Una volta avvenuto il legame ligando-recettore la risposta iniziale è data dall'autofosforilazione del residuo tirosinico che innesca l'attività tirosin chinasi del recettore. Entrambi i recettori (IR e IGF-1R) si legano e fosforilano altre proteine cellulari necessarie per la trasduzione del segnale intracellulare. In particolare, comuni substrati

proteici come ad esempio i substrati insulino-simili (IRS1-4), una volta attivati innescano le vie del fosfatidil-inositolo-3-idrossi-fosfato (PI3K) e MAP-kinasi (MAPK) che rappresentano importanti cascate di segnale intracellulare che esplicano le funzioni biologiche dei recettori. Evidenze sperimentali indicano che entrambi i recettori sono in grado di attivare le proteine SAT, implicate nei meccanismi di ingresso e di trasporto del glucosio a livello cellulare [14]. Mentre queste vie di segnale sono comuni sia a IR che a IGF-1R, esistono altre vie più specifiche che determinano la peculiarità di ogni singolo recettore. Ad esempio IR è un attivatore della via di segnale TC10 (CAP/Cbl/CrkII/C3G/T10) che collabora con la via del PI3K nella regolazione della captazione di glucosio cellulare [15]. IR è tradizionalmente un recettore con attività metabolica in quanto le sue principali funzioni sono rappresentate dallo stoccaggio del glucosio, delle proteine e dei lipidi e dal loro rilascio da parte del fegato, del tessuto adiposo e del muscolo. Al contrario i fattori di crescita insulino-simili sono importanti regolatori della crescita d'organo e corporea ma hanno anche la funzione di salvaguardare la vitalità cellulare soprattutto in condizioni di stress. E' importante sottolineare che il recettore insulinico comprende due isoforme, il IR-A e il IR-B che sono il



risultato di uno *splicing* alternativo. La forma mitogenica A (IR-A) manca di una sequenza amminoacidica in posizione 12 codificata dall'esone 11; IR-A si lega con elevata affinità all'insulina ma è in grado di legarsi ad IGF-1, ad IGF-2 e alla pro-insulina, tuttavia con un'affinità simile ma nettamente inferiore a quella dell'insulina [16-18]. La struttura metabolica dell'isoforma metabolica B (IR-B) è invece intera ed è principalmente attivata dall'insulina. Mentre IR-A è espresso in maniera ubiquitaria in tutti i tessuti dell'adulto, IR-B è espresso principalmente nei classici tessuti che regolano l'omeostasi del glucosio tra cui il fegato, il muscolo scheletrico e il tessuto adiposo [19].

Studi condotti in diversi laboratori hanno dimostrato che i ligandi IGF-1, IGF-2 e insulina attivano diverse vie di segnale e di espressione genica attraverso IGF-1R [20-22].

Le sei IGFBPs hanno diverse funzioni anche piuttosto complesse. Ad esempio sono proteine di trasporto dei fattori di crescita insulino-simili, che permettono di evitare la loro proteolisi in circolo ma allo stesso tempo sono modulatrici dell'attività dei ligandi. IGFs circolano principalmente come complesso ternario

di 150 kDa rappresentato da IGFBP-3 (o IGFBP-5), una subunità acido-labile e IGF-1 o IGF-2. IGFs circolanti si allontanano dalla circolazione come complessi binari sempre legati alle IGFBPs e raggiungono i tessuti bersaglio dove vengono rilasciati mediante un processo enzimatico attivato dopo l'interazione col proprio recettore. In circolo ritroviamo una quantità molto limitata di IGFs liberi in quanto questo vengono rapidamente degradati da enzimi proteolitici.

## **Studi Epidemiologici**

### *Obesità e sindrome metabolica*

Una certa percentuale di individui affetti da obesità non presentano le complicanze di quest'ultima e questi possono essere definiti con “obesi in salute” mentre la maggioranza presenta tutta una serie di condizioni associate all'obesità che nel complesso viene definita come sindrome metabolica (Tab 1).

L'identificazione della sindrome metabolica rappresenta un importante problema medico soprattutto per la nota associazione con l'aumentato rischio cardiovascolare, con l'ipertensione arteriosa e con alterazioni metaboliche quali

la dislipidemia e la condizione definita come pre-diabete. Inoltre i dati più recenti indicano che la sindrome metabolica, frequentemente associata all'obesità può associarsi ad un aumentato rischio di cancro e alla mortalità cancro-correlata.

Tab 1. Sindrome Metabolica: presenza di 3 o più fattori di rischio	
Fattori di rischio	Definizione
1) Obesità addominale	Circonferenza vita*
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Uomo</li> <li>▪ Donna</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ &gt;101 cm</li> <li>▪ &gt;88 cm</li> </ul>
2) Trigliceridi (mg/dl)	≥150
3) HDL-C (mg/dl)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Uomo</li> <li>▪ Donna</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ &lt;40</li> <li>▪ &lt;50</li> </ul>
4) Pressione arteriosa (mmHg)	≥130/≥85
5) Glicemia a digiuno (mg/dl)	≥100
* Punti di divisione inferiori per gli Americani asiatici	

Nel corso degli ultimi decenni, l'obesità può essere considerata come una vera e propria epidemia a impatto mondiale. Tutti i paesi occidentalizzati e in via di sviluppo ne sono colpiti. La definizione di obesità ha subito importanti cambiamenti. Tradizionalmente l'obesità è stata definita come un indice di massa

corporea  $> 30 \text{ kg/m}^2$  calcolata come il rapporto tra il peso espresso in chilogrammi (Kg) e l'altezza espressa in metri al quadrato ( $\text{m}^2$ ) di un individuo. Secondo questa definizione, oltre il 30 % degli adulti americani sono obesi, mentre un altro terzo della popolazione è in sovrappeso ( $\text{BMI } 26\text{-}30 \text{ kg/m}^2$ ). Molti altri paesi, sia in Europa che nel mondo, tra cui Australia, seguono questo modello. (Tab 2)

<b>Tab 2. Parametri per la definizione di sovrappeso e obesità</b>	
	<b>IMC (Indice di Massa Corporea) <math>\text{kg/m}^2</math></b>
Sovrappeso	BMI 26-30
Obesità	BMI $\geq 30$
Obesità grave	BMI $\geq 40$

La preoccupazione per il sempre più crescente numero di soggetti obesi ha recentemente motivato l'American Medical Association a classificare l'obesità come una "malattia", mentre in precedenza era considerato un "disturbo".

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, nel 2008, oltre 1,4 miliardi di adulti (11%) di tutto il mondo erano in sovrappeso ( $\text{BMI} > 25 \text{ kg / m}^2$ ), di cui ~ 300 milioni erano obesi ( $\text{BMI} > 30 \text{ kg / m}^2$ ) [23] e l'incidenza è in rapido aumento.

Negli Stati Uniti la stime di persone in sovrappeso è ~ 66% e la metà di questi sono obesi [24].

Diversi studi hanno dimostrato un aumento del rischio di cancro e di mortalità per cancro nei pazienti con sindrome metabolica [25, 26]. Un recente studio condotto su oltre 33.000 uomini esenti da cancro e seguiti per 14 anni ha dimostrato un incremento significativo del rischio di mortalità per cancro nei 9000 soggetti affetti da sindrome metabolica al momento dell'arruolamento [27]. Altri studi prospettici hanno inoltre evidenziato una correlazione tra obesità, l'insorgenza di nuovi casi di tumore e mortalità per cancro [28, 29]. Un elevato peso corporeo è stato associato ad un aumentato rischio di alcuni tipi di cancro, compresi i tumori del colon, dell'esofago, del rene, del pancreas, e della cistifellea, e nelle donne del carcinoma mammario e del sistema riproduttivo. Una importante meta-analisi, che valuta i risultati di un numero elevato di studi, ha mostrato che un significativo aumento dei tumori, sia negli uomini che nelle donne, si associa ad un aumento BMI di 5 kg / m<sup>2</sup> [30]. Nel Nurses' Health study [31] e nello studio di Lahmann [32], l'adiposità centrale determinata dalla circonferenza vita e il rapporto vita-fianchi erano associate ad un aumento del rischio di carcinoma della mammella in

post-menopausa. Al contrario, tra le donne in pre-menopausa, la maggior parte degli studi di coorte non hanno riscontrato alcuna associazione tra obesità e cancro mammario [33]. L'assenza di associazione tra obesità e carcinoma mammario in pre-menopausa rispetto all'aumentata frequenza riscontrata in post-menopausa potrebbe essere legato alle modificazioni dell'attività ovarica che si hanno in queste due fasi della vita della donna con particolare riguardo al rapporto tra estrogeni e progesterone circolante. Fattori predittivi per lo sviluppo del carcinoma mammario nelle donne in post-menopausa sono generalmente riconosciuti da una dieta ricca di grassi [34], l'altezza [35], la distribuzione del grasso corporeo [31, 36, 37] e il cambiamento di peso durante l'età adulta [38, 39]. Anche gli studi condotti nel Regno Unito (Million Women Study) e negli Stati Uniti (Cancer Prevention Study II) hanno riscontrato nei soggetti obesi una aumentata mortalità per cancro [40]. La correlazione tra mortalità per cancro mammario, diabete mellito tipo 2 e sovrappeso è stata confermata da ulteriori studi che hanno dimostrato un aumentato rischio di mortalità per carcinoma mammario molto significativo

(aumento del 30-100% a seconda degli studi) [29, 41-43] mentre il rischio di sviluppare il carcinoma mammario era relativamente modesto (12-20%).

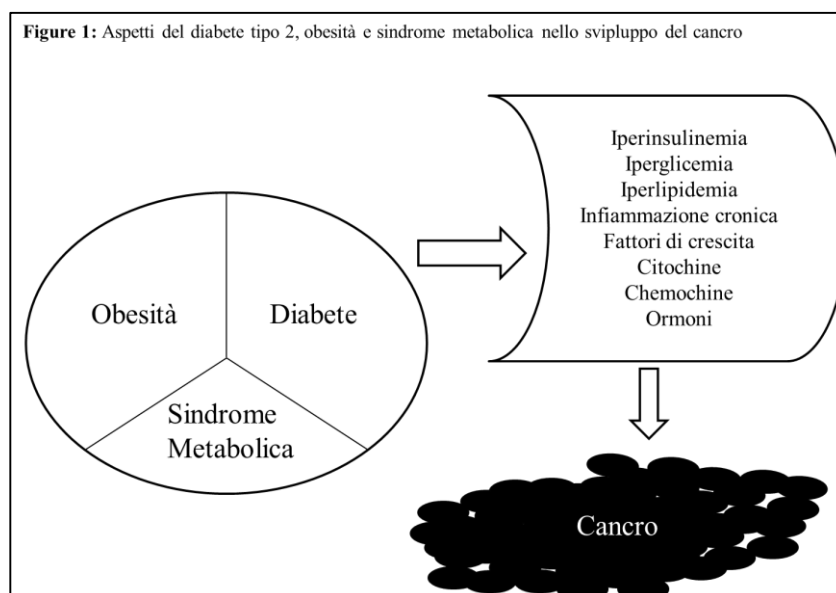
*Può la risoluzione dell'obesità ridurre il rischio di cancro e della mortalità cancro-correlata?*

L'obesità può essere drasticamente curata con la chirurgia bariatrica e un gran numero di studi di coorte suggeriscono che sia il rischio di cancro che la mortalità cancro-correlata possono essere ridotti dopo questo tipo di intervento. Lo studio della “Swedish Obesity Subject (SOS)” mostra che le donne che andavano incontro ad una perdita di peso di oltre il 30% avevano una riduzione del rischio di cancro di circa il 41% [44]. Nel “Women’s Intervention Nutrition study (WINS)” una ulteriore riduzione del 5% del peso nei 5 anni successivi si associava ad una riduzione del rischio di cancro della mammella del 24% [45].

Quindi è ben dimostrata da studi epidemiologici la correlazione tra obesità, sindrome metabolica e l'aumentata incidenza di cancro della mammella: è importante sottolineare che la riduzione della mortalità per questa patologia

neoplastica nelle pazienti obese si ha dopo una riduzione significativa del peso corporeo con interventi chirurgici appropriati.

Nella Fig.1 sono indicati i fattori che possono spiegare lo sviluppo di un cancro: l'obesità, il diabete, la sindrome metabolica sono condizioni cliniche in cui si verifica un aumento dei livelli di insulina, di glicemia, lo sviluppo di fattori pro-infiammatori, l'attività di IGFs, le modificazioni di chemochine e adipochine. Tutti questi fattori influenzano drasticamente la proliferazione cellulare a livello degli organi e possono essere in alcuni casi responsabili della proliferazione neoplastica.





## **Studi clinici**

### *Insulina e Recettore insulinico*

La possibile relazione tra i livelli circolanti di insulina e C-peptide e la prognosi del carcinoma della mammella è stata dimostrata negli studi di Goodwin et al. [46]. I pazienti non diabetici con valori di insulina nel quartile più alto, una misura dell'insulino-resistenza, mostravano una significativa riduzione della sopravvivenza. Un' ulteriore conferma deriva dai dati provenienti dallo studio GOH di Israele con un *follow up* di 29 anni: valori di insulina a digiuno nel quartile più alto si associavano ad un incremento pari al 37% del rischio di mortalità per cancro della mammella rispetto ai soggetti con valori di insulina a digiuno nel quartile più basso [47]. Il risultato di uno studio prospettico, osservazionale "Healt, Eating, Activity and Lifestyle (HEAL)" su 604 donne alle quali era stato diagnosticato un carcinoma mammario in vario stadio clinico, ha dimostrato una correlazione tra valori elevati di C-peptide a digiuno e un aumento della mortalità per cancro della mammella: un incremento di 1 ng/ml di C-Peptide si associava al 31% di aumentato rischio di decesso e al 35% di rischio di decesso per il

carcinoma della mammella. Questa associazione fra C-peptide e mortalità per carcinoma mammario più aggressivo era riscontrata anche in donne con valori di BMI <25 Kg/m<sup>2</sup> [48]. E' stato inoltre dimostrato [49] che il riscontro di elevati valori di insulina nella fase iniziale del cancro della mammella si associa ad un maggior rischio di recidiva a distanza e maggior rischio di mortalità che è più evidente nei primi 5 anni. Questi ultimi due studi indicano chiaramente il ruolo fondamentale dell'insulina nello spiegare questa associazione: gli altri fattori correlati all'obesità (BMI, peso, leptina) si possono come noto modificare nel tempo e quindi la loro variazione può influenzare l'andamento della malattia neoplastica [49]. E' stato suggerito da Ruiter et al. [50] che anche l'insulina esogena potrebbe essere ritenuta responsabile dell'aumentato rischio di sviluppare il cancro della mammella. Tuttavia in questo studio i soggetti erano trattati con dosi molto elevate di insulina e per tempi prolungati. Recenti studi controllati non hanno confermato l'associazione tra dosi terapeutiche di insulina e rischio di cancro mentre hanno confermato l'aumentato rischio in condizioni di iperinsulinemia endogena [51]. A questo proposito l' "European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition", il "Physicians Health Study" e lo

“Women Health Initiative” hanno riportato un incremento significativo del carcinoma della mammella, una prognosi peggiore e un aumento della mortalità per tumore nelle pazienti in post-menopausa con valori aumentati di insulina e C-peptide[52].

E' noto che l'insulina agisce a livello cellulare legandosi al suo recettore specifico IR: una espressione di IR è stata osservata in tutti i sottotipi di carcinoma della mammella ed è generalmente associato ad una prognosi peggiore [53-55]. Di estrema importanza sarà quindi verificare se l'iperinsulinemia si associa ad un'iperespressione del recettore insulinico nella proliferazione carcinomatosa. Oltre a livelli elevati di insulina in circolo, il recettore insulinico (IR) nel tessuto tumorale gioca un ruolo importante.

#### IGFs e recettori IGFs

L'associazione tra i livelli sierici di IGF-1 e IGFBP-3 e il rischio di carcinoma mammario rimane ad oggi ancora controverso. I primi studi come ad esempio quello della “Nurse' Healt” hanno evidenziato che il rischio di sviluppare il cancro

della mammella è aumentato nelle donne in pre-menopausa che presentano livelli di IGF-1 ai limiti superiori del range di normalità con bassi valori di IGFBP-3 circolanti [54, 55] e nelle donne in post menopausa come descritto nello studio “EPIC” [56] ed è stato ipotizzato che una riduzione dei livelli di IGFBP-3 potrebbe causare un aumento dei livelli "liberi" di IGF-1. Tuttavia, i dati sono controversi soprattutto a causa della difficoltà del dosaggio della IGFBP-3 [54].

In un recente studio condotto in Olanda la sopravvivenza nelle donne con carcinoma mammario non era associato a livelli sierici di IGF-1 (o IGFBP-3) ad eccezione delle donne che avevano ricevuto terapia ormonale sostitutiva [57].

Il ruolo dell'IGF-1R nel carcinoma della mammella è un argomento a tutt'oggi controverso e i risultati degli studi sono spesso contrastanti. Infatti, i primi studi mostravano che l'espressione dell'IGF-1R incrementava progressivamente dal tessuto mammario normale, ai tumori benigni della mammella ed era ancora di più espresso nei tumori maligni. Tuttavia, studi successivi hanno dimostrato che un'elevata espressione dell'IGF-1R era riscontrata nei tumori meno aggressivi, ER positivi e Her2 negativi [58] mentre era associata ad una prognosi sfavorevole

nei carcinomi mammari ER e PR negativi e ad elevata espressione Her2 (TNBC) [59, 60].

E' stato inoltre dimostrato come una prognosi sfavorevole si associ ai tumori con espressione di IGF-1R e negatività dei ER rispetto al carcinoma mammario negativo per espressione dell'IGF-1R e con ER positivi [61].

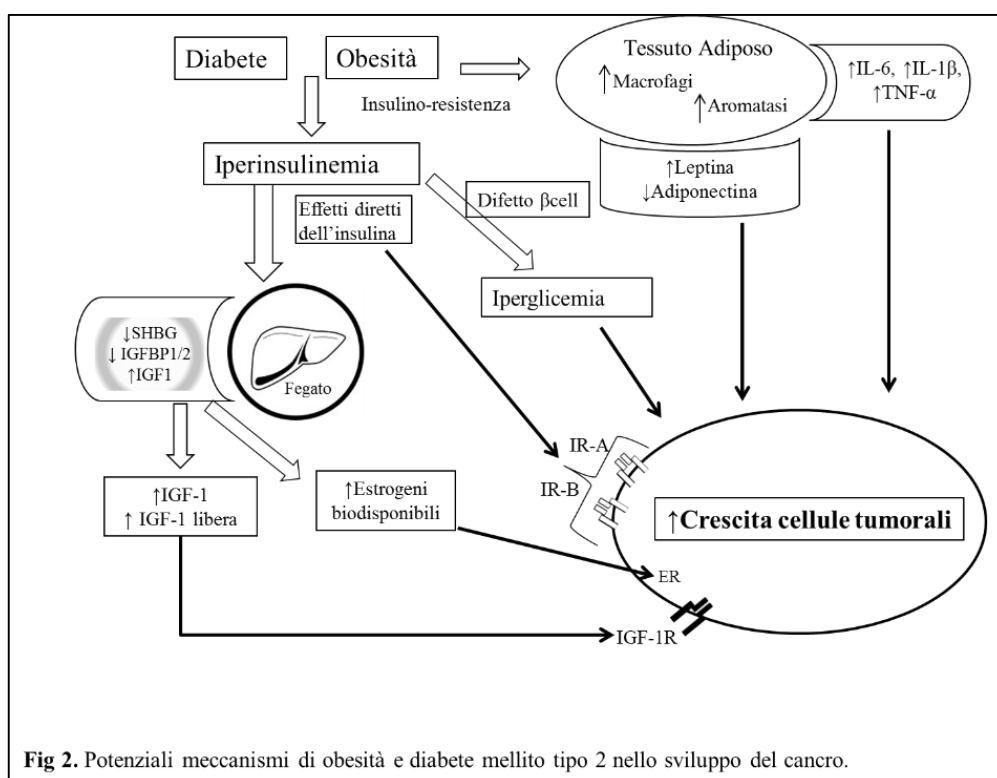
Inoltre i livelli di IGF-1 liberi e totali hanno dimostrato rispettivamente un incremento del 28% e una riduzione del 16% nelle pazienti con carcinoma mammario in fase iniziale [62].

Gli studi condotti sul ruolo dell'IGF-2 circolante nel carcinoma mammario sono limitati ed in particolare è stato evidenziato un andamento simile all'IGF-1 per quanto concerne il cancro mammario in fase iniziale.

Di notevole importanza invece è il ruolo paracrina dell'IGF-2 nel cancro della mammella. Gli studi condotti da Giani et al. hanno dimostrato che la sintesi dell'IGF-2 è stromale e che successivamente è in grado di interagire con la cellula epiteliale neoplastica [63]. E' probabile che IGF-2 interagisca con IGF-1R espresso sulla cellula tumorale regolandone quindi la proliferazione. Infatti

l'espressione di IGF-2 mRNA stromale si associa ad una positività dell'espressione dell'oncogene p53 e ad una elevata attività proliferativa (Ki67) quindi in definitiva ad una prognosi peggiore [64, 65].

In figura 2 sono riassunti i meccanismi che influenzano la crescita e la moltiplicazione delle cellule tumorali.



Come si può notare risulta evidente il ruolo centrale dell'obesità, dell'insulino-resistenza e dell'iperinsulinemia e i meccanismi che comportano l'incremento

dell'IGF-1 circolante e in particolare della forma libera, degli estrogeni biodisponibili e delle loro interazioni con i rispettivi recettori, dell'azione diretta dell'insulina, dell'attività dei fattori infiammatori locali e del ruolo della leptina: tutto questo converge nell'effetto finale che è la crescita delle cellule tumorali. Come si può osservare è fondamentale il ruolo dell'espressione recettoriale sulle cellule tumorali, sia IGF-1R sia le due forme di IR, e ai fattori endocrini circolanti che intereagiscono con questi deve essere aggiunta anche l'attività paracrina di IGF-2.

## **INSULINA E RECETTORE INSULINICO**

Studi condotti su modelli sperimentali insulino-deficienti hanno dimostrato la potente attività promuovente la crescita tumorale da parte dell'insulina e in particolare è stato dimostrato che la riduzione dei livelli circolanti di insulina in modelli animali mediante la somministrazione di farmaci inducenti un diabete mellito tipo 1, si associava ad una riduzione della crescita tumorale; questo effetto veniva annullato dalla somministrazione di insulina esogena [66]. La somministrazione di insulina esogena sembra indurre l'attivazione del IR mentre rimane ancora da chiarire l'effetto sull'IGF-1R [12]. L'espressione del recettore insulinico è stata riscontrata sia nelle linee cellulari di cancro della mammella che in campioni di tumore primitivo. Studi in vitro hanno dimostrato che l'insulina promuove la crescita cellulare di un certo numero di cellule derivate dal carcinoma mammario umano incluse le MCF-7 (cellule in coltura che esprimono il recettore estrogenico e progestinico e negatività di ERB2), T47D (cellule che esprimono il recettore per gli estrogeni, androgeni, PRL, calcitonina e aril-idrocarburico) e ZR-75-1 (cellule che esprimono il recettore estrogenico e progestinico). Milazzo et al hanno dimostrato che le linee cellulari di carcinoma mammario MCF-7 e le ZR-



75-1 presentano livelli di IR rispettivamente 5 volte e 3 volte superiori i livelli di IR nella linea cellulare di mammella umana o della linea cellulare di carcinoma mammario T47D [67].

L'attivazione del recettore insulinico nelle cellule T47D è secondaria all'attivazione di entrambe le vie di segnale PI3K e MAPK e della via mitotica, accompagnata da un'aumentata espressione della ciclina D1, la proteina che regola la via PI3K che è coinvolta nella progressione del ciclo cellulare [68]. Invece la crescita delle altre linee cellulari (MCF-7 e ZR-75-1) sotto lo stimolo insulinico sembra essere dovuta solo all'attivazione della via di segnale MAPK. In esperimenti eseguiti da Gliozzo et al. sulla linea cellulare ZR-75-1 [69], la mitosi indotta dall'insulina non è associata ad un cambiamento nell'attività PI3K né viene bloccata se la via PI3K viene inibita; tuttavia si accompagna a un aumento della fosforilazione tirosinica di Shc e l'attività MAPK è soppressa solo in presenza di un inibitore della MAPK.

Questi dati suggeriscono che la crescita delle cellule tumorali di carcinoma mammario con espressione del recettore estrogenico può essere stimolata

dall'insulina attraverso diverse vie. Esistono tuttavia dati sperimentali anche su linee cellulari di cancro della mammella umano ER-negativo che evidenziano un forte effetto proliferativo da parte dell'insulina [70].

Dall'altra parte l'insulina può inibire l'apoptosi nelle cellule tumorale e questo effetto potrebbe favorire l'accumulo di un sempre maggior numero di cellule carcinomatose prodotte da un'aumentata attività mitotica. Teng et al. ha riscontrato che l'insulina long-acting analoga della glargina, determina una parziale soppressione dell'apoptosi delle cellule MCF-7, secondaria alla down-regulation della proteina Bax e da una up-regulation della proteina Bcl-2 [71], implicate nella regolazione del ciclo cellulare.

Studi su modello animale hanno dimostrato un effetto dell'obesità sulla progressione del cancro. La restrizione calorica, che riduce la crescita tumorale e le metastasi nei topi utilizzando la linea murina 4T1 del tumore mammario, è stato associata ad una riduzione dei livelli di insulina e di IGF-1 circolanti [72]. Questi e altri studi che hanno utilizzato come modello animale i topi obesi per studiare la progressione del cancro, hanno portato i diversi autori a ritenere che l'insulino-

resistenza e la concomitante iperinsulinemia può essere uno dei fattori eziologici che guidano la progressione del tumore. LeRoith et al. hanno sviluppato un modello murino, denominato topo MKR, in cui è stata geneticamente indotta una grave insulino-resistenza nel muscolo scheletrico che ha portato alla resistenza insulinica a livello epatico e a livello del tessuto adiposo e nel complesso a generato un quadro di iperinsulinemia. I topi maschi sono diabetici, mentre i topi femmina manifestano solo iperinsulinemia e per questo sono stati utilizzati per gli studi sul cancro della mammella [13]. Questi studi utilizzano l'inoculazione ortotopica di diverse linee cellulari tumorali mammarie murine (Met-1, MCNeuA, Mvt-1) che esprimono oncogeni derivati da vari modelli di cancro al seno nel topo transgenico (MMTV-PyVmT, MMTV-neu, MMTV-c-myc / VEGF), così come il modello transgenico doxiciclina-inducibile Neu-NT (MTB / TAN) incrociato con i topi MKR [73, 74]. Gli studi condotti da LeRoith et al. dimostrano che i topi MKR presentano in maniera costante una maggiore crescita dei tumori mammari primari e delle metastasi polmonari rispetto ai controlli wild-type (WT). I tumori sviluppati nei topi MKR mostrano una maggiore fosforilazione del IR e di Akt, proteina tirosin-chinasica espressa dalle cellule tumorali, suggerendo che

l'iperinsulinemia è la forza trainante di mediazione di questo effetto [12, 13].

Riducendo l'iperinsulinemia utilizzando il CL-316243, una potente insulina ad attività sensibilizzante agonista del recettore beta-3adrenergico, la crescita del tumore e le metastasi sono inibite [73, 75]. Il ruolo specifico del IR e PI3K / Akt / mTOR (mammalian target of rapamycin, proteina chinasi che fosforila treonina e serina che regola il ciclo cellulare) in questo processo è stato ulteriormente esaminato da una serie di studi. L'insorgenza di tumori promossa dall'iperinsulinemia è stata inibita in topi trattati con BMS MKR-536924, una piccola molecola che inibisce IGF-1R / IR [13]. Inoltre anche il blocco farmacologico di PI3K e mTOR da parte di NVP-BKM120 (inibitore di PI3K), rapamicina (inibitore di mTOR) e NVP-BEZ235 (inibitore di entrambi PI3K / mTOR) riduce la crescita tumorale e la progressione metastatica mediate dall'iperinsulinemia [75, 76]. Per capire se l'effetto iperinsulinemico sulla crescita del tumore e delle metastasi sia associato ad una transizione epitelio-mesenchimale e / o ad altri fattori di progressione del tumore, sono stati studiati altri fattori noti per essere coinvolti in questi processi. L'iperinsulinemia inoltre è in grado di agire attraverso altri meccanismi che regolano la proliferazione cellulare. E' stato infatti

dimostrato che i tumori dei topi MKR presentano un'aumentata espressione di vimentina, c-myc e MMP-9, che sono noti fattori associati all'invasività e all'aggressività del tumore [73, 74]. In un recente studio è stato dimostrato che l'inibizione del IR utilizzando shRNAs (short hairpin RNA) in cellule di carcinoma mammario LCC6 e T47D determina una riduzione delle metastasi in topi atimici non diabetici [77], che avvalora quindi di ulteriori prove il ruolo del IR nel controllo del processo di metastatizzazione. E' emerso inoltre che il IR è implicato nel meccanismo di resistenza ad alcuni farmaci antitumorali, tra cui gli inibitori IGF-1R [78, 79] e antiestrogeni [80, 81].

Pertanto in modelli animali di iperinsulinemia è provato che l'insulina tramite l'IR è un importante mediatore della crescita tumorale e delle metastasi nell'obesità e nell'insulino-resistenza, sostenendo e avvalorando gli studi epidemiologici umani e preliminari che per primi hanno ipotizzato questo effetto.

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Studi preliminari hanno dimostrato l'importanza dell'iperinsulinemia sulla progressione del carcinoma mammario in topi MKR. I topi MKR sono un modello murino insulino-resistente e con iperinsulinemia ottenuta dopo inattivazione dell'IGF-1R a livello muscolare [82]. Principalmente è stato dimostrato come le femmine MKR presentano uno sviluppo significativamente maggiore del tessuto mammario rispetto ai topi WT ed è stato dimostrato che il principale responsabile di questo maggiore sviluppo è rappresentato dal recettore insulinico, che si ritrova in una quantità 3 volte maggiore nel tessuto mammario del topo MKR rispetto al topo WT. Utilizzando questo modello iperinsulinemico è stato osservato un incremento significativo della crescita del tumore mammario transgenico PyVmT ed è stato dimostrato che il meccanismo che spiega il rapporto tra la crescita e l'iperinsulinemia è rappresentato dall'aumentata attivazione del recettore insulinico e del recettore IGF-1 e le vie di segnale intracellulare PI3K/Akt/mTOR [13].

Da un punto di vista clinico è noto che circa il 25% dei carcinoma della mammella presentano una positività di HER2+ che si associa ad un elevato rischio di sviluppo di metastasi a distanza e ad una prognosi peggiore [83, 84]. Inoltre recentemente, in uno studio retrospettivo, sono stati valutati i benefici della terapia con metformina e tiazolidinedioni in donne affette da diabete mellito tipo 2 e carcinoma mammario HER-2+. Anche se nella prima fase di analisi si riscontrava una prognosi peggiore in termini di sopravvivenza nelle donne con carcinoma mammario e diabete mellito tipo 2 indipendentemente da altri fattori (come ad esempio l'espressione del recettore estrogenico e del recettore progestinico) nell'analisi delle sole donne affette da diabete mellito tipo 2 si dimostrava che la terapia con anti-diabetici orali comportava una prognosi migliore [85].

Il modello murino transgenico di Her2, che presenta l'attivazione dell'oncogene Neu-NT (corrispettivo umano di HER2+) doxiciclina inducibile sviluppa un carcinoma mammario invasivo nell'arco di 3 mesi [86].

In un recente studio di Ferguson et al [87], per valutare se la progressione del tumore mammario fosse influenzata dall'iperinsulinemia, il modello Neu-NT è

stato incrociato con il topo MKR. Questo ha generato un topo iperinsulinemico esprime il transgene Neu-NT doxibicilina-inducibile (RTTA/Neu-MKR+) che sviluppavano carcinomi mammari più aggressivi e un maggior numero di metastasi rispetto ai topi WT (RTTA/Neu-MKR-).

Al fine di valutare i possibili meccanismi coinvolti è stata studiata l'espressione della vimentina, C-Myc e MMP-9, noti fattori associati all'invasività e all'aggressività del tumore secondaria all'iperinsulinemia che sono risultati maggiormente espressi nei topi RTTA/Neu-MKR+ rispetto agli WT [73, 88].

Scopo del presente studio è stato quello di valutare l'espressione cellulare del recettore insulinico (IR) nel carcinoma mammario dei topi RTTA/Neu-MKR+. I risultati erano paragonati con quelli ottenuti nel carcinoma mammario di topi RTTA/Neu-MKR- e nel tessuto mammario normale di topi MKR-.



## MATERIALI E METODI

### Modello animale

Sono stati utilizzati 5 topi transgenici di tipo RTTA/Neu-MKR+. Al fine di avere un adeguato gruppo di controllo sono stati selezionati 10 topi normali non iperinsulinemici, 5 topi con carcinoma mammario non iperinsulinemici (RTTA/Neu-MKR-: WT) e anche 1 topo knock out per recettore insulinico.

Tutti gli animali si trovavano all'interno della struttura adibita agli animali da esperimento presso il Dipartimento di Endocrinologia del Mount Sinai Hospital di New York. Tutte le procedure erano approvate dalla Commissione Responsabile della cura e dell'uso degli animali del Mount Sinai Hospital in accordo con le Linee di Consenso dell'Istituto Nazionale di Sanità. Tutti i topi utilizzati erano vaccinati per il virus B.

I topi erano tenuti in apposite gabbie. Erano stati posizionati 4 topi per ogni gabbia ad un ciclo giorno/notte di 12 ore, alimentati con dieta chow standard, a basso contenuto di carboidrati (*PicoLab Rodent Diet 20,5053; LabDiet Brentwood, MO, USA*). I livelli di insulina plasmatica erano misurati utilizzando il kit "rat insulin

radioimmunoassay (RIA) (Millipore, St. Charles, MO, USA). Per attivare l'oncogene Neu-NT, l'acqua dei topi era arricchita con 1.5 mg/ml di doxyciclina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). L'acqua arricchita da doxyciclina era cambiata 2 volte la settimana.

Lo sviluppo del tumore veniva valutato attraverso indagine ecografica. Una volta evidenziato lo sviluppo del tumore il suo volume veniva misurato periodicamente ogni 2 settimane. Una volta raggiunta la dimensione tra 30 e 40 mm la neoplasia veniva asportata. Il volume del tumore è stato calcolato utilizzando le tre coordinate e usando la formula:  $\text{Volume} = \frac{4}{3} \pi (\text{lunghezza} / 2 \times \text{larghezza} \times \text{profondità} / 2 \times / 2)$ . Le lesioni asportate venivano incluse in paraffina e sezionate (spessore 5 micron).

### Immunoistochimica

I tessuti paraffinati del carcinoma mammario murino venivano utilizzati per lo studio dell'espressione del recettore insulinico utilizzando una metodica immunoistochimica.

I campioni erano deparaffinati ponendoli per 30 minuti nell'incubatrice a 50° centigradi e successivamente progressivamente reidratati in Xylene, soluzione di Xylene e etanolo 100%, etanolo 100%, etanolo 95%, etanolo 70% e in acqua distillata e infine incubati in acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) per 5 minuti e poi lavati con acqua distillata.

Il processo di “recupero dell'antigene” si otteneva immergendo i campioni in buffer citrato (pH 6): il contenitore con i vetrini veniva immerso nella pentola a pressione, a pressione massima, per 15 minuti. Successivamente i campioni, immersi nel buffer citrato, venivano raffreddati a temperatura ambiente e successivamente lavati in PBS per 10 minuti. I campioni venivano quindi trattati con la soluzione di blocco con Buffer fosfato salino+2 gocce siero di cavallo e infine posizionati in camera “umida” per 1 ora.

I campioni venivano quindi trattati con soluzione contenete anticorpo primario (anticorpo policlonale di coniglio anti-recettore dell'insulina alla concentrazione 1:500: *Abcam, Cambridge, MA, USA*). Nei controlli negativi veniva omissa il trattamento con l'anticorpo primario ed utilizzata al suo posto la soluzione di

blocco. I campioni così trattati venivano conservati in camera fredda a 4° centigradi per tutta la notte.

I campioni venivano successivamente lavati in PBS per 5 minuti e incubati con la soluzione contenente l'anticorpo secondario per 30 minuti (*Vectastain Universal Anti-topo IgG/anti coniglio IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*). La successiva attivazione enzimatica veniva ottenuta attraverso "ABC reagent kit" (*Vectastain Universal Anti-topo IgG/anti coniglio IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*). Tale attivazione necessitava di una incubazione di 30 minuti e successivamente i preparati venivano incubati per 8 minuti con la soluzione di ossidazione (DAB solution) e successivamente si effettuava il lavaggio con acqua distillata. La colorazione si otteneva ponendo le sezioni in ematossilina per 1 minuto, successivamente in acido alcoolico e in ammonio idrossidato. Le sezioni così trattate venivano reidratate e montate su apposito supporto per la visione al microscopio.

L'espressione del recettore insulinico sui tessuti mammari neoplastici del topo così ottenuti veniva confrontata con l'espressione del recettore insulinico del

tessuto mammario di topo normale, del topo KD e del carcinoma mammario del topo WT.

#### Valutazione immunoistochimica al microscopio

Per la valutazione dei preparati istologici e l'esecuzione delle fotografie è stato utilizzato il microscopio Olympus Ax70 con il software Olympus Cell Sens.

Ogni preparato è stato visualizzato ad ingrandimenti di 4x, 20x e 40x. Al momento della foto, per ogni campione e per ciascun ingrandimento è stato utilizzato lo stesso tempo di esposizione (per il 4x: 1.242 msec; per il 20x: 2.600 msec; per il 40x: 6.309 msec).

Veniva valutata l'intensità di colorazione all'immunoistochimica e paragonata con quella riscontrata nella mammella del topo normale non iperinsulinemico. La valutazione era condotta separatamente da 2 operatori e risultati paragonati. Le variazioni dell'intensità di colorazione venivano graduate in una scala da + a +++.

## RISULTATI

In figura 3a, 3b e 3c è riportata l'espressione del recettore insulinico con tecnica immunoistochimica nei tessuti mammari normali. Come si può notare, una colorazione positiva era riscontrata a livello delle cellule mammarie dei dotti. Per ogni figura è riportato il controllo negativo (NC). Questo consente di verificare la specificità del segnale (+).

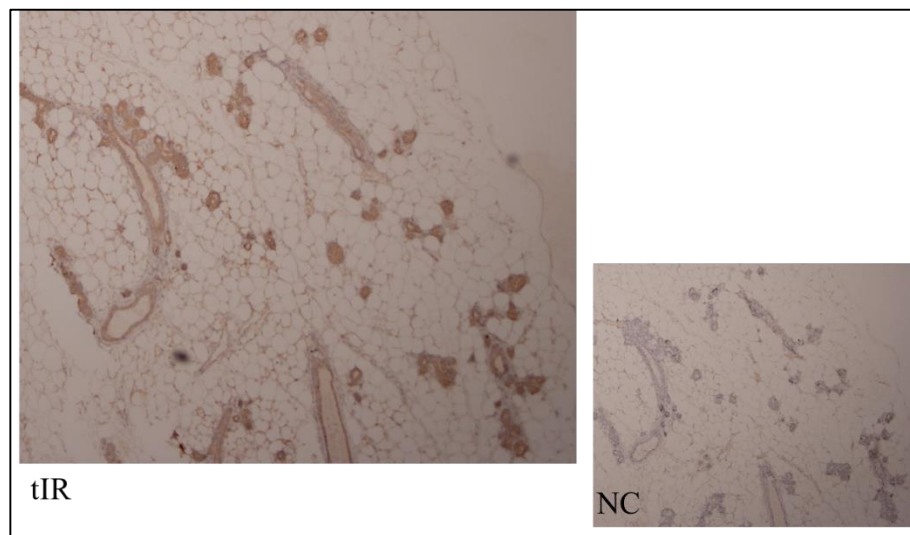


Fig. 3a: ingrandimento 4x

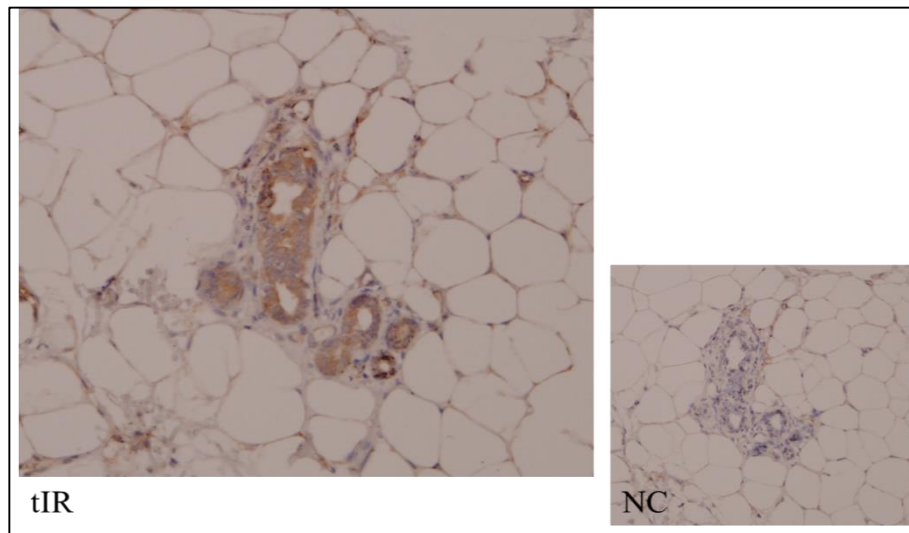


Fig. 3b: ingrandimento 20x

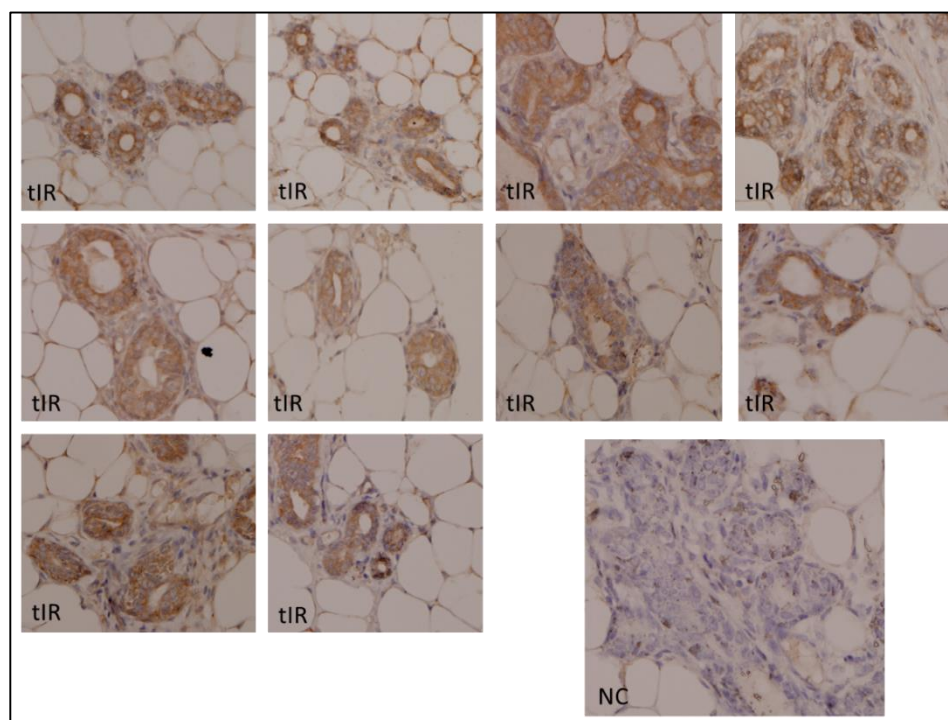


Fig. 3c: ingrandimento 40x

In figura 4a, 4b e 4c è riportata l'espressione del recettore insulinico nei tessuti di carcinoma mammario RTTA/Neu-MKR- (WT). Si può notare l'incremento della

positività dell'immunoistochimica del recettore insulinico ad un livello superiore (++) rispetto a quella riscontrata nel tessuto mammario (+). Anche in questo caso, per ogni figura, è riportato il controllo negativo.

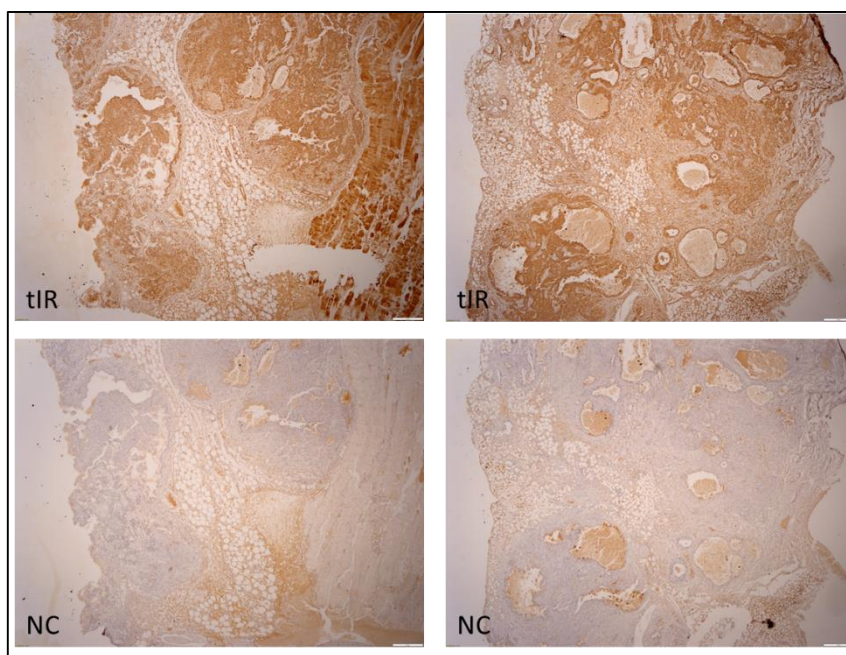


Fig. 4a: ingrandimento 4x



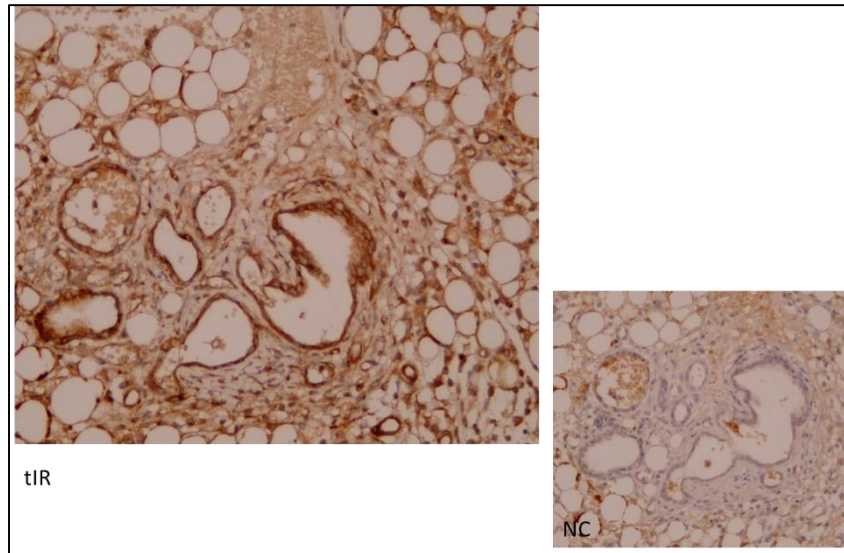


Fig. 4b: ingrandimento 20x

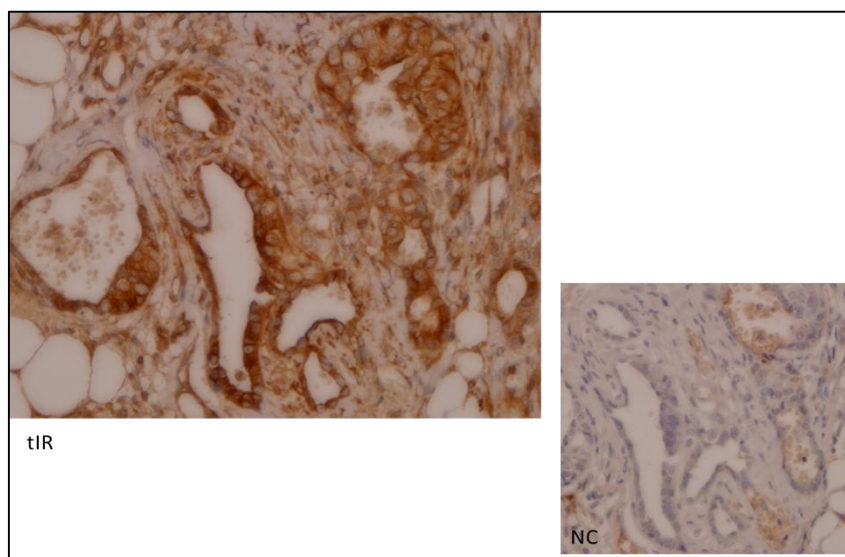


Fig. 4c: ingrandimento 40x

Le figure 5a, 5b e 5c indicano i risultati ottenuti nel tessuto di carcinoma mammario RTTA/Neu-MKR+. Come si può notare la positività era riscontrata ad un livello ancora più elevato (+++) rispetto al carcinoma mammario del topo WT (++) e ancora di più del tessuto mammario normale (+).

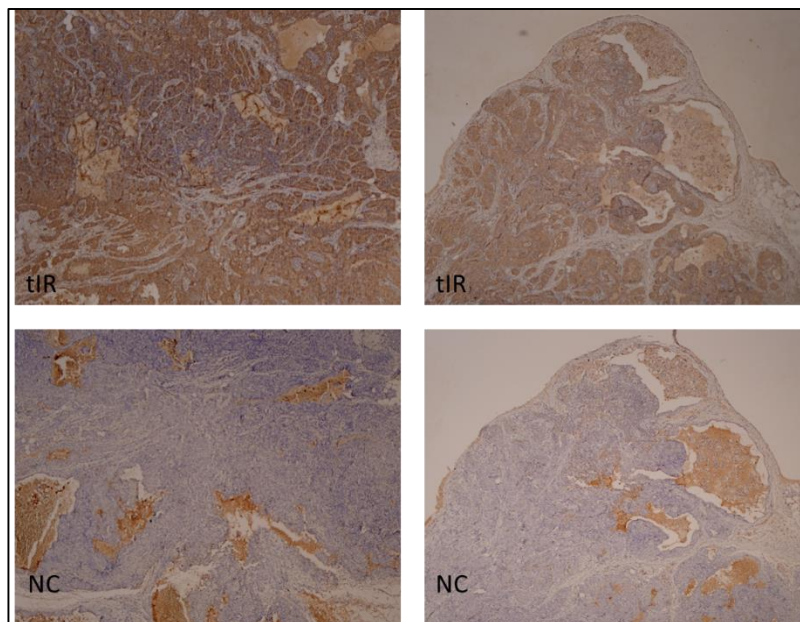


Fig. 5a: ingrandimento 4x

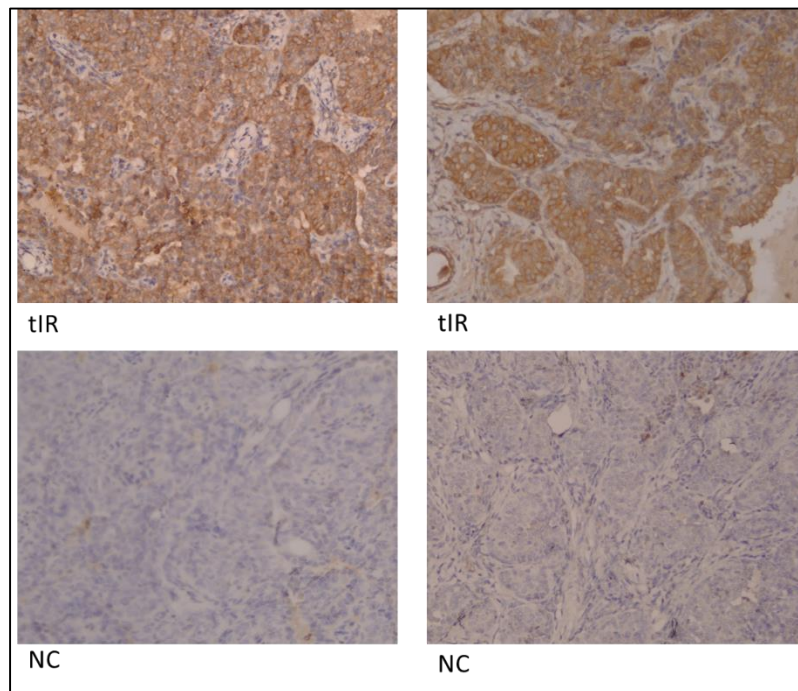


Fig. 5b: ingrandimento 20x

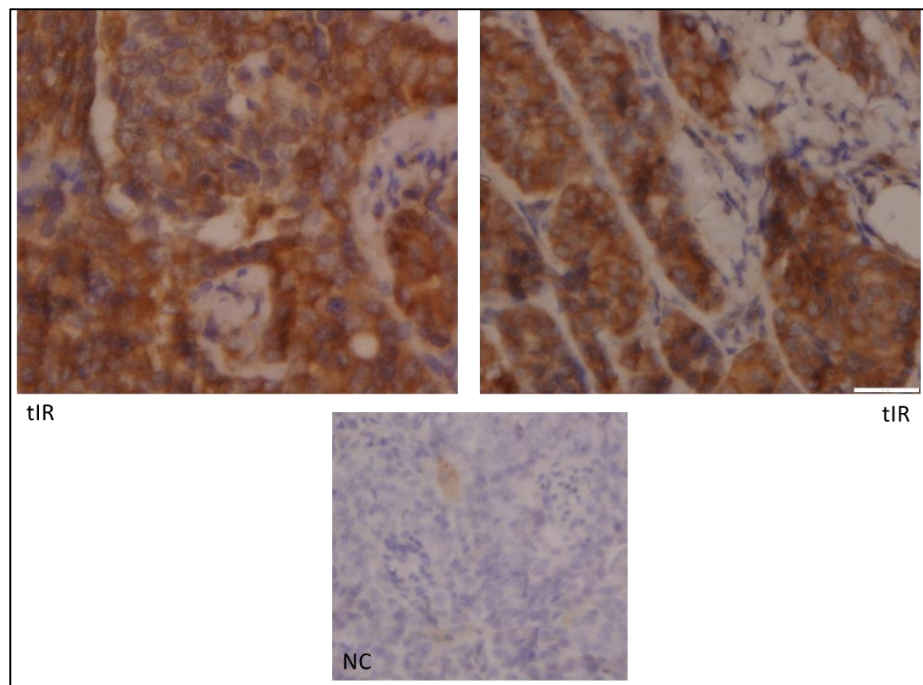


Fig. 5c: ingrandimento 40x

La positività era riscontrata sostanzialmente in maniera uniforme in ogni caso (+ immunohistochimica nei tessuti normali, ++ nei WT e +++ nei topi RTT/Neu-MKR+). La colorazione era riscontrata a livello della membrana cellulare e come si può notare, nel carcinoma mammario RTT/Neu-MKR+ l'entità dell'espressione era associata anche ad una maggiore proliferazione cellulare.

Al fine di verificare la specificità del legame dell'anticorpo policlonale anti-recettore insulinico abbiamo ripetuto l'indagine immunohistochimica nel tessuto mammario del topo knock-out (KD) per il recettore insulinico. Come si può osservare in figura 6 non era documentabile nessun segnale, indicando quindi che il legame con l'anticorpo ed il recettore insulinico è specifico.

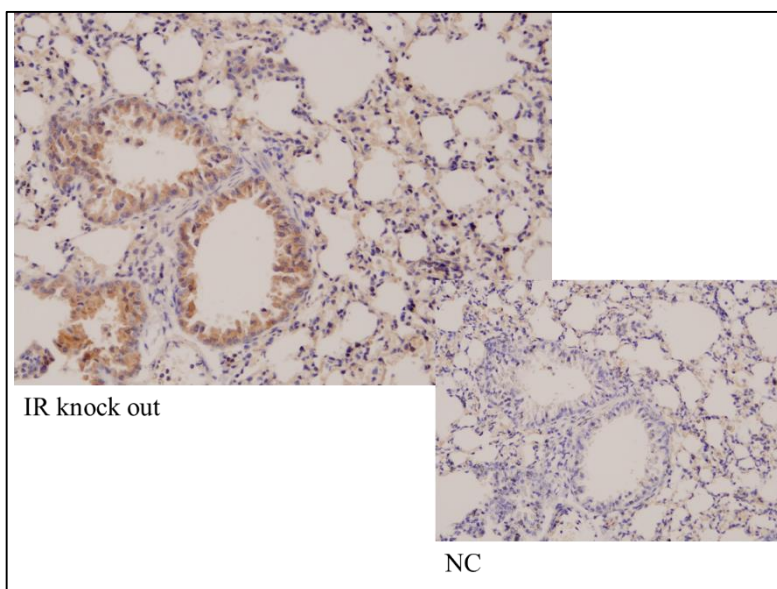


Fig. 6



In figura 7 è paragonata l'espressione del recettore tra tessuto mammario normale, tessuto di carcinoma mammario nel topo WT e tessuto di carcinoma mammario nel topo MKR.

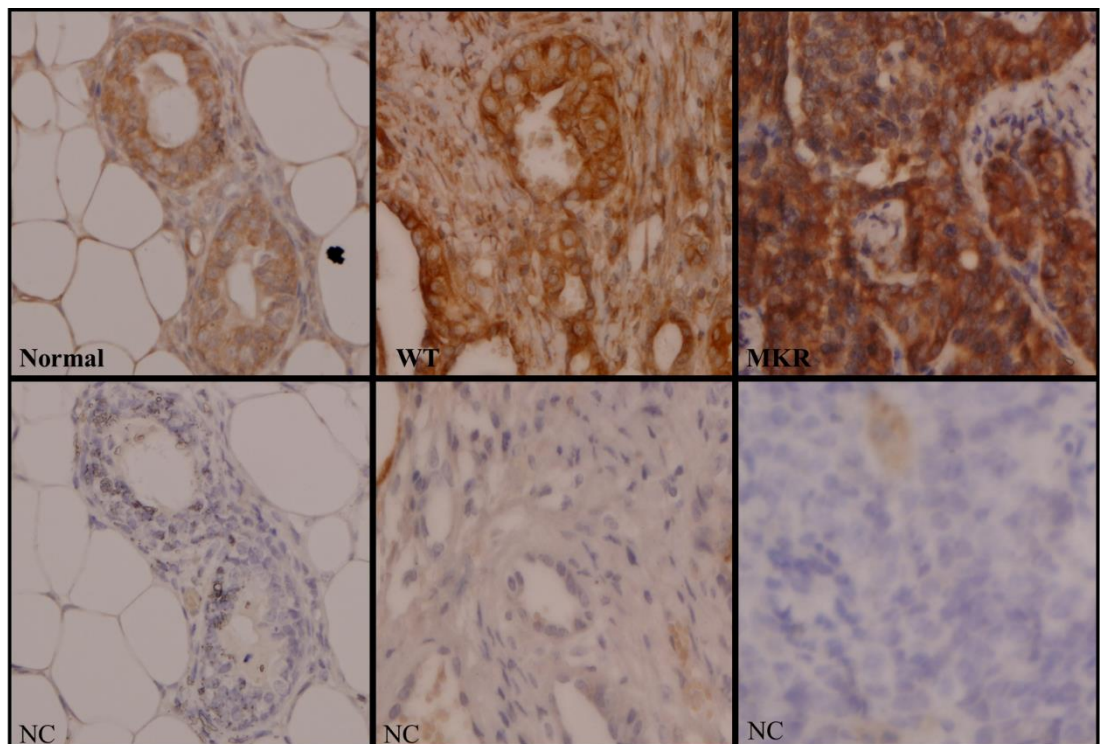


Fig. 7

Come si può osservare è chiaramente presente un progressivo incremento della positività di espressione del recettore insulinico dal tessuto mammario normale, al carcinoma mammario WT al carcinoma mammario MKR.

Si può quindi concludere che il recettore insulinico è espresso da tessuto mammario normale. La trasformazione neoplastica si associa ad un aumento dell'espressione del recettore insulinico che diventa massimale quando si associa all'iperinsulinemia.

.

## **DISCUSSIONE**

E' ormai ampiamente dimostrato che l'obesità e la sindrome metabolica, frequentemente associate, rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie maligne e sono associate ad un'aumentata mortalità per cancro [1].

Numerose evidenze epidemiologiche suggeriscono la presenza di una correlazione fra il diabete mellito tipo 2 e l'incidenza, la recidiva e la mortalità per cancro della mammella [7]. L'iperinsulinemia è stata identificata come un fattore specifico che induce la proliferazione neoplastica nel cancro mammario: questi dati provengono generalmente da studi sulla patologia neoplastica indotta nell'animale mentre dati che correlino l'iperinsulinemia a particolari sottotipi di cancro mammario sono limitati.

E' noto che l'iperpressione dell'oncogene HER2+ è responsabile di circa il 25% di carcinoma mammario umano e generalmente è correlato con un atteggiamento aggressivo del tumore che metastatizza frequentemente al polmone [83, 84]. Un recente studio di LeRoith et al., utilizzando il modello animale del topo MKR ha

dimostrato che l'iperinsulinemia, in maniera significativa, è in grado di condizionare lo sviluppo del tumore mediato dall'attivazione dell'oncogene Neu-NT (HERB2+) e la progressione delle metastasi al livello polmonare. Dunque l'iperinsulinemia almeno nella patologia animale è in grado di mediare la proliferazione cellulare e l'aggressività del tumore.

E' noto che l'insulina è in grado di agire a livello tissutale attraverso recettore specifici di membrana (recettore per insulina e anche se in misura minore sul recettore dell'IGF1). L'importanza di questi recettori insulinici e insulino-simili nella regolazione della proliferazione neoplastica anche nell'uomo è stata dimostrata da numerosi studi: è generalmente accettato che fattori di crescita IGF-1 e IGF-2 siano in gran parte di origine stromale e che hanno la capacità di interagire sul recettore specifico localizzato a livello della cellula tumorale della mammella regolando la proliferazione neoplastica [63-65].

In questo studio utilizzando lo stesso ceppo animale del gruppo di LeRoith et al. abbiamo voluto verificare una correlazione tra iperinsulinemia e il recettore insulinico al fine di verificare se l'iperpressione di questo recettore potesse essere



responsabile della proliferazione tumorale e spiegare l'aggressività della neoplasia nei topi iperinsulinemici.

A questo proposito un precedente studio condotto da Ferguson et al. ha dimostrato che in topi MKR, l'iperinsulinemia era capace di mediare lo sviluppo e la progressione del cancro mammario indipendentemente dall'obesità attivando il recettore insulinico, l'IGF-1R e la via della P3IK [13]. Dunque l'iperinsulinemia sembra rappresentare l'elemento fondamentale della progressione del cancro della mammella agendo su specifici recettori la cui attivazione regola la proliferazione neoplastica.

Il recettore insulinico è stato determinato su campioni di tessuto mammario paraffinati, successivamente sottoposti a tecniche di deparaffinizzazione, con la tecnica immunoistochimica utilizzando l'anticorpo policlonale specifico antirecettore insulinico. La tecnica si è dimostrata di buona sensibilità, specificità e riproducibilità.

Il recettore insulinico veniva espresso nei 10 tessuti mammari di topi normali non iperinsulinemici con un'intensità di colorazione che veniva indicata come +. Una

espressione maggiore ++ veniva riscontrata nei 5 tessuti di carcinoma mammario di topi non iperinsulinemici. Mentre una nettissima positività (+++) era riscontrata nei 5 topi transgenici di RTTA/Neu-MKR+. Il progressivo incremento della positività del recettore insulinico che si otteneva nei topi WT indica che l'espressione di questo recettore si associa alla proliferazione tumorale. Di estrema importanza il dato originale della ulteriore nettissima positività che si ottiene nel carcinoma mammario dei topi iperinsulinemici.

In conclusione i precedenti dati del Prof. LeRoith indicano che l'iperinsulinemia è associata a neoplasie mammarie ad alto grado di aggressività nel topo: i risultati di questo studio, nel quale sono stati utilizzati gli stessi ceppi animali, indicano che IR è normalmente espresso dal tessuto mammario normale, che la trasformazione neoplastica si associa ad una maggiore positività e che questa è massimale nel carcinoma mammario dei topi MKR. Si può quindi ipotizzare che l'iperinsulinemia, associata o meno ad obesità, possa agire a livello delle cellule neoplastiche attraverso un legame con il suo recettore specifico; questo fatto innesca tutti gli eventi a livello cellulare implicati nella proliferazione neoplastica.

I dati in patologia umana sono attualmente molto limitati. Tuttavia studi preliminari condotti presso il laboratorio del Prof. LeRoith hanno dimostrato, utilizzando sempre la tecnica immunoistochimica, un'iperespressione del recettore insulinico in gran parte dei carcinomi della mammella. Sarà quindi importante valutare l'istotipo di questi tumori, l'espressione degli oncogeni associati alla progressione tumorale, l'aggressività delle neoplasie con l'eventuale iperinsulinemia e resistenza insulinica: questi dati saranno di notevole importanza per valutare l'opportunità di una terapia che sia in grado di interagire con l'iperinsulinemia e con l'espressione del recettore insulinico come ad esempio la metformina o farmaci che svolgono un'azione simile.

Potrebbe quindi in definitiva essere un nuovo strumento terapeutico nel carcinoma della mammella in particolari condizioni.

## BIBLIOGRAFIA

1. Vigneri, P., et al., *Diabetes and cancer*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(4): p. 1103-23.
2. El-Serag, H.B., H. Hampel, and F. Javadi, *The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006. **4**(3): p. 369-80.
3. Friberg, E., et al., *Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis*. Diabetologia, 2007. **50**(7): p. 1365-74.
4. Huxley, R., et al., *Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies*. Br J Cancer, 2005. **92**(11): p. 2076-83.
5. Larsson, S.C., N. Orsini, and A. Wolk, *Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(22): p. 1679-87.
6. Larsson, S.C., et al., *Diabetes mellitus and risk of bladder cancer: a meta-analysis*. Diabetologia, 2006. **49**(12): p. 2819-23.
7. Larsson, S.C., C.S. Mantzoros, and A. Wolk, *Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis*. Int J Cancer, 2007. **121**(4): p. 856-62.
8. Washio, M., et al., *Diabetes mellitus and kidney cancer risk: the results of Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk (JACC Study)*. Int J Urol, 2007. **14**(5): p. 393-7.
9. Rasmussen, A.A. and K.J. Cullen, *Paracrine/autocrine regulation of breast cancer by the insulin-like growth factors*. Breast Cancer Res Treat, 1998. **47**(3): p. 219-33.
10. Michell, N.P., M.J. Langman, and M.C. Eggo, *Insulin-like growth factors and their binding proteins in human colonocytes: preferential degradation*

*of insulin-like growth factor binding protein 2 in colonic cancers.* Br J Cancer, 1997. **76**(1): p. 60-6.

11. DiGiovanni, J., et al., *Deregulated expression of insulin-like growth factor 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3455-60.
12. Gallagher, E.J., et al., *Insulin receptor phosphorylation by endogenous insulin or the insulin analog AspB10 promotes mammary tumor growth independent of the IGF-I receptor.* Diabetes, 2013. **62**(10): p. 3553-60.
13. Novosyadlyy, R., et al., *Insulin-mediated acceleration of breast cancer development and progression in a nonobese model of type 2 diabetes.* Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 741-51.
14. Chen, J., et al., *Stat5 is a physiological substrate of the insulin receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2295-300.
15. Chiang, S.H., et al., *Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10.* Nature, 2001. **410**(6831): p. 944-8.
16. Belfiore, A. and R. Malaguarnera, *Insulin receptor and cancer.* Endocr Relat Cancer, 2011. **18**(4): p. R125-47.
17. Malaguarnera, R., et al., *Insulin receptor isoforms and insulin-like growth factor receptor in human follicular cell precursors from papillary thyroid cancer and normal thyroid.* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(3): p. 766-74.
18. Malaguarnera, R. and A. Belfiore, *The insulin receptor: a new target for cancer therapy.* Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 93.
19. Mosthaf, L., et al., *Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing.* EMBO J, 1990. **9**(8): p. 2409-13.
20. Lammers, R., et al., *Differential signalling potential of insulin- and IGF-1-receptor cytoplasmic domains.* EMBO J, 1989. **8**(5): p. 1369-75.

21. Verstehe, S., et al., *IGF-I, IGF-II, and Insulin Stimulate Different Gene Expression Responses through Binding to the IGF-I Receptor*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 98.
22. Dupont, J. and D. LeRoith, *Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction*. Horm Res, 2001. **55 Suppl 2**: p. 22-6.
23. Haslam, D.W. and W.P. James, *Obesity*. Lancet, 2005. **366**(9492): p. 1197-209.
24. Ogden, C.L., et al., *Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004*. JAMA, 2006. **295**(13): p. 1549-55.
25. Russo, A., M. Autelitano, and L. Bisanti, *Metabolic syndrome and cancer risk*. Eur J Cancer, 2008. **44**(2): p. 293-7.
26. Pothiwala, P., S.K. Jain, and S. Yaturu, *Metabolic syndrome and cancer*. Metab Syndr Relat Disord, 2009. **7**(4): p. 279-88.
27. Jaggers, J.R., et al., *Metabolic syndrome and risk of cancer mortality in men*. Eur J Cancer, 2009. **45**(10): p. 1831-8.
28. Polednak, A.P., *Trends in incidence rates for obesity-associated cancers in the US*. Cancer Detect Prev, 2003. **27**(6): p. 415-21.
29. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. N Engl J Med, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
30. Bergstrom, A., et al., *Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe*. Int J Cancer, 2001. **91**(3): p. 421-30.
31. Huang, Z., et al., *Waist circumference, waist:hip ratio, and risk of breast cancer in the Nurses' Health Study*. Am J Epidemiol, 1999. **150**(12): p. 1316-24.

32. Lahmann, P.H., et al., *Long-term weight change and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)*. Br J Cancer, 2005. **93**(5): p. 582-9.
33. Manjer, J., et al., *Risk of breast cancer in relation to anthropometry, blood pressure, blood lipids and glucose metabolism: a prospective study within the Malmo Preventive Project*. Eur J Cancer Prev, 2001. **10**(1): p. 33-42.
34. Gordon, R.R., et al., *Genotype X diet interactions in mice predisposed to mammary cancer. I. Body weight and fat*. Mamm Genome, 2008. **19**(3): p. 163-78.
35. Ziegler, R.G., et al., *Relative weight, weight change, height, and breast cancer risk in Asian-American women*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(10): p. 650-60.
36. Bruning, P.F., et al., *Body measurements, estrogen availability and the risk of human breast cancer: a case-control study*. Int J Cancer, 1992. **51**(1): p. 14-9.
37. Folsom, A.R., et al., *Increased incidence of carcinoma of the breast associated with abdominal adiposity in postmenopausal women*. Am J Epidemiol, 1990. **131**(5): p. 794-803.
38. Carpenter, C.L., et al., *Effect of family history, obesity and exercise on breast cancer risk among postmenopausal women*. Int J Cancer, 2003. **106**(1): p. 96-102.
39. Harvie, M., et al., *Association of gain and loss of weight before and after menopause with risk of postmenopausal breast cancer in the Iowa women's health study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(3): p. 656-61.
40. Beral, V. and C. Million Women Study, *Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. Lancet, 2003. **362**(9382): p. 419-27.

41. Bianchini, F., R. Kaaks, and H. Vainio, *Overweight, obesity, and cancer risk*. Lancet Oncol, 2002. **3**(9): p. 565-74.
42. Renehan, A.G., et al., *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. Lancet, 2008. **371**(9612): p. 569-78.
43. Barone, B.B., et al., *Long-term all-cause mortality in cancer patients with preexisting diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2008. **300**(23): p. 2754-64.
44. Sjostrom, L., et al., *Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial*. Lancet Oncol, 2009. **10**(7): p. 653-62.
45. Adams, T.D., et al., *Long-term mortality after gastric bypass surgery*. N Engl J Med, 2007. **357**(8): p. 753-61.
46. Goodwin, P.J., et al., *Fasting insulin and outcome in early-stage breast cancer: results of a prospective cohort study*. J Clin Oncol, 2002. **20**(1): p. 42-51.
47. Dankner, R., et al., *Effect of elevated basal insulin on cancer incidence and mortality in cancer incident patients: the Israel GOH 29-year follow-up study*. Diabetes Care, 2012. **35**(7): p. 1538-43.
48. Irwin, M.L., et al., *Fasting C-peptide levels and death resulting from all causes and breast cancer: the health, eating, activity, and lifestyle study*. J Clin Oncol, 2011. **29**(1): p. 47-53.
49. Goodwin, P.J., et al., *Insulin- and obesity-related variables in early-stage breast cancer: correlations and time course of prognostic associations*. J Clin Oncol, 2012. **30**(2): p. 164-71.
50. Ruiter, R., et al., *Risk of cancer in patients on insulin glargine and other insulin analogues in comparison with those on human insulin: results from*



- a large population-based follow-up study*. Diabetologia, 2012. **55**(1): p. 51-62.
51. Grimaldi-Bensouda, L., et al., *Risk of breast cancer by individual insulin use: an international multicenter study*. Diabetes Care, 2014. **37**(1): p. 134-43.
  52. Verheus, M., et al., *Serum C-peptide levels and breast cancer risk: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)*. Int J Cancer, 2006. **119**(3): p. 659-67.
  53. Law, J.H., et al., *Phosphorylated insulin-like growth factor-i/insulin receptor is present in all breast cancer subtypes and is related to poor survival*. Cancer Res, 2008. **68**(24): p. 10238-46.
  54. Renehan, A.G., M. Harvie, and A. Howell, *Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and breast cancer risk: eight years on*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(2): p. 273-8.
  55. Schernhammer, E.S., et al., *Circulating levels of insulin-like growth factors, their binding proteins, and breast cancer risk*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(3): p. 699-704.
  56. Rinaldi, S., et al., *IGF-I, IGFBP-3 and breast cancer risk in women: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(2): p. 593-605.
  57. Hartog, H., et al., *Prognostic value of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding protein 3 blood levels in breast cancer*. Breast, 2013. **22**(6): p. 1155-60.
  58. Yerushalmi, R., et al., *Insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) in breast cancer subtypes*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **132**(1): p. 131-42.
  59. Hartog, H., et al., *Divergent effects of insulin-like growth factor-1 receptor expression on prognosis of estrogen receptor positive versus triple negative*

- invasive ductal breast carcinoma*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **129**(3): p. 725-36.
60. Iqbal, J., et al., *Insulin growth factor receptor-1 expression and loss of PTEN protein predict early recurrence in triple-negative breast cancer*. Histopathology, 2012. **61**(4): p. 652-9.
  61. Railo, M.J., K. von Smitten, and F. Pekonen, *The prognostic value of insulin-like growth factor-I in breast cancer patients. Results of a follow-up study on 126 patients*. Eur J Cancer, 1994. **30A**(3): p. 307-11.
  62. Espelund, U., et al., *Elevated free IGF2 levels in localized, early-stage breast cancer in women*. Eur J Endocrinol, 2008. **159**(5): p. 595-601.
  63. Giani, C., et al., *Stromal IGF-II messenger RNA in breast cancer: relationship with progesterone receptor expressed by malignant epithelial cells*. J Endocrinol Invest, 1998. **21**(3): p. 160-5.
  64. Giani, C., et al., *IGF-II mRNA and protein are expressed in the stroma of invasive breast cancers: an in situ hybridization and immunohistochemistry study*. Breast Cancer Res Treat, 1996. **41**(1): p. 43-50.
  65. Fiore, E., et al., *IGF-II mRNA expression in breast cancer: predictive value and relationship to other prognostic factors*. Int J Biol Markers, 2010. **25**(3): p. 150-6.
  66. Heuson, J.C. and N. Legros, *Influence of insulin deprivation on growth of the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma in rats subjected to alloxan diabetes and food restriction*. Cancer Res, 1972. **32**(2): p. 226-32.
  67. Milazzo, G., et al., *Insulin receptor expression and function in human breast cancer cell lines*. Cancer Res, 1992. **52**(14): p. 3924-30.
  68. Chappell, J., et al., *Effect of insulin on cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells. Direct and potentiating influence*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 38023-8.

69. Gliozzo, B., et al., *Insulin-stimulated cell growth in insulin receptor substrate-1-deficient ZR-75-1 cells is mediated by a phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway*. J Cell Biochem, 1998. **70**(2): p. 268-80.
70. Sepp-Lorenzino, L., N. Rosen, and D.E. Lebowitz, *Insulin and insulin-like growth factor signaling are defective in the MDA MB-468 human breast cancer cell line*. Cell Growth Differ, 1994. **5**(10): p. 1077-83.
71. Teng, J.A., et al., *Glargine promotes proliferation of breast adenocarcinoma cell line MCF-7 via AKT activation*. Horm Metab Res, 2011. **43**(8): p. 519-23.
72. De Lorenzo, M.S., et al., *Caloric restriction reduces growth of mammary tumors and metastases*. Carcinogenesis, 2011. **32**(9): p. 1381-7.
73. Ferguson, R.D., et al., *Hyperinsulinemia enhances c-Myc-mediated mammary tumor development and advances metastatic progression to the lung in a mouse model of type 2 diabetes*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(1): p. R8.
74. Ferguson, R.D., et al., *Hyperinsulinemia promotes metastasis to the lung in a mouse model of Her2-mediated breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 2013. **20**(3): p. 391-401.
75. Fierz, Y., et al., *Mammalian target of rapamycin inhibition abrogates insulin-mediated mammary tumor progression in type 2 diabetes*. Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(4): p. 941-51.
76. Gallagher, E.J., et al., *Inhibiting PI3K reduces mammary tumor growth and induces hyperglycemia in a mouse model of insulin resistance and hyperinsulinemia*. Oncogene, 2012. **31**(27): p. 3213-22.
77. Zhang, H., et al., *Inhibition of cancer cell proliferation and metastasis by insulin receptor downregulation*. Oncogene, 2010. **29**(17): p. 2517-27.

78. Ulanet, D.B., et al., *Insulin receptor functionally enhances multistage tumor progression and conveys intrinsic resistance to IGF-1R targeted therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(24): p. 10791-8.
79. Buck, E., et al., *Compensatory insulin receptor (IR) activation on inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R): rationale for cotargeting IGF-1R and IR in cancer*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(10): p. 2652-64.
80. Fox, E.M., et al., *A kinome-wide screen identifies the insulin/IGF-I receptor pathway as a mechanism of escape from hormone dependence in breast cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(21): p. 6773-84.
81. Fagan, D.H., et al., *Acquired resistance to tamoxifen is associated with loss of the type I insulin-like growth factor receptor: implications for breast cancer treatment*. Cancer Res, 2012. **72**(13): p. 3372-80.
82. Fernandez, A.M., et al., *Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes*. Genes Dev, 2001. **15**(15): p. 1926-34.
83. Slamon, D.J., et al., *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science, 1989. **244**(4905): p. 707-12.
84. Seshadri, R., et al., *Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group*. J Clin Oncol, 1993. **11**(10): p. 1936-42.
85. He, X., et al., *Metformin and thiazolidinediones are associated with improved breast cancer-specific survival of diabetic women with HER2+ breast cancer*. Ann Oncol, 2012. **23**(7): p. 1771-80.
86. Ursini-Siegel, J., et al., *Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(5): p. 389-97.
87. Novosyadlyy, R., et al., *Physical and functional interaction between polyoma virus middle T antigen and insulin and IGF-I receptors is required*

*for oncogene activation and tumour initiation.* Oncogene, 2009. **28**(39): p. 3477-86.

88. Baserga, R., F. Peruzzi, and K. Reiss, *The IGF-1 receptor in cancer biology.* Int J Cancer, 2003. **107**(6): p. 873-7.



## **RINGRAZIAMENTI**

Per prima cosa credo sia doveroso ricordare il Prof. Aldo Pinchera. Grazie a lui è stata creata l'Endocrinologia Pisana e l'importante scuola di specializzazione che ho avuto la fortuna di poter frequentare.

Detto questo vorrei ringraziare i due Direttori, il Prof. Paolo Vitti e il Prof. Claudio Marcocci con cui ho avuto la possibilità di lavorare e di arricchire le mie conoscenze.

Ma il mio grazie più grande va ovviamente al Prof. Claudio Giani, il mio mentore. Il mio non è un grazie qualunque. E' uno di quei grazie con la "G" maiuscola. Uno di quei grazie che poche volte nella vita si dicono. Grazie per l'incredibile opportunità che mi ha dato. Grazie per aver avuto fiducia in me e nelle mie capacità, per avermi teso una mano quando ne avevo bisogno, per avermi aiutato a ripartire e a camminare a testa alta.

Grazie per tutto quello che mi ha insegnato, per quello che ancora mi sta insegnando e per quello che mi insegnerà in futuro.

Ovviamente ringrazio il Dott. Emilio Fiore e tutti gli altri medici con cui ho avuto la possibilità di collaborare in questo percorso.

Ringrazio tutto il personale infermieristico con il quale ho lavorato in questi anni. Per il loro prezioso lavoro senza il quale sarebbe stato difficile operare quotidianamente.

Grazie alla segreteria di Endocrinologia e soprattutto a Laura, un'amica sincera su cui ho sempre potuto contare.

Ringrazio la grande famiglia degli Specializzandi e soprattutto le mie "Brazt" Eleonora, Federica ed Ilaria, colleghe ma anche grandi amiche in tutto e per tutto. Senza di voi questo percorso non sarebbe stato lo stesso e ciò che più mi riempie di gioia è sapere che ci saremo sempre l'una per le altre.

Grazie a Claudio, Anna, Giulia, Antonella, Laura, Silvia, Filippo, Angelo e a tutti gli altri.

Grazie alle amiche di sempre Elena, Paola e Giulia, le amiche di una vita che, nonostante siano lontane dall'endocrinologia, camminano ancora oggi al mio fianco.

Grazie ai miei genitori. Senza di loro non sarebbe stato possibile realizzare i miei sogni e i miei progetti. Grazie per avermi sempre appoggiato in tutto e per tutto.

E grazie a Lorena, Guido e Pierina per tutto quello che avete fatto per me in questi anni.



E per finire ringrazio la persona più importante della mia vita, Marco. Grazie per essere sempre stato accanto a me, per avermi supportato e soprattutto sopportato.